DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.021
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1065-04

论著

大肠癌组织中胃泌素与癌基因c-myc、c-fos、ras p21表达和AgNORs计数的关系

何双梧,何渝军,沈康强,陈 锦 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨大肠癌组织中胃泌素与癌基因c-myc、c-fos、ras p21表达和核仁组成区嗜银染色(AgNORs)计数的关系及其意义。方法 对48例大肠癌病人癌组织进行检测,采用免疫组化S-P法测胃泌素、c-myc、c-fos、和ras p21表达,改良银染法测AgNORs计数,并与癌旁3 cm、6 cm粘膜及正常大肠粘膜作对照。结果 癌组织胃泌素、c-myc、c-fos、ras p21表达的阳性率和AgNORs计数均显著高于癌旁3 cm、6 cm粘膜和正常大肠粘膜($P<0.01$),高分化腺癌组胃泌素表达阳性率明显高于低分化腺癌和粘液腺癌组($P<0.05$),大肠癌组织胃泌素阳性组中c-myc、c-fos的阳性率及AgNORs计数均明显高于胃泌素阴性组($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$)。结论 部分大肠癌细胞可自分泌产生胃泌素,介导调节c-myc、c-fos和ras p21癌基因扩增,从而促进癌细胞的增殖。

关键词:大肠癌;胃泌素;癌基因;核仁组成区嗜银染色
中图法分类号:R392.13;R735.35 文献标识码:A

Relationship of the expression of gastrin and oncogene c-myc, c-fos, ras p21 with AgNORs counting in colorectal carcinoma tissue

HE Shuang-wu, HE Yu-jun, SHEN Kang-qiang, CHEN Jin (Department of General Surgery, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medicine University, Chongqing 400042, China)

Absract: Objective To study the relationship of the expression of gastrin and oncogene c-myc, c-fos, ras p21 with AgNORs counting in colorectal carcinoma tissue and its clinical significance. Methods The expression of gastrin and c-myc, c-fos ras p21 of carcinoma tissue in 48 cases were detected with S-P immunocytochemical method. The argyrophilia nucleolar organizer regions (AgNORs) was counted with modified Ag stain and, their expression in the mucosa 3 cm, 6 cm adjacent to carcinoma tissue and normal colorectal mucosa were also counted to be used in comparison. Results The positive expression rate of gastrin, c-myc, c-fos and ras p21 and AgNORs counting in carcinoma tissue were significantly higher than that in mucosa 3 cm, 6 cm adjacent to carcinoma tissue and normal colorectal mucosa ($P<0.01$ all). The positive expression rate of gastrin was significantly higer in highly-differentiated adenocarcinoma group than in poorly-differentiated and mucinous adenocarcinoma group($P<0.05$). The positive expression rate of c-myc and c-fos and AgNORs counting were siginificantly higher in gastrin-positive group than in gastrin-negative group($P<0.05$, $P<0.01$). Conclusion Certain colorectal carcinoma cells can form and secrete gastrin through autocrine and mediate the proliferation of carcinoma cells through the modulation of the amplification of oncogene c-myc, c-fos and ras p21.

Key words: colorectal carcinoma; gastrin; oncogene; AgNORs

近年来一些研究发现胃泌素对部分大肠癌的发生、发展具有促进作用,但其机制尚不十分清楚,我们通过检测大肠癌患者癌组织中胃泌素、癌基因c-myc、c-fos、ras p21表达、核仁组成区嗜银染色(AgNORs)计数,以探讨大肠癌组织中胃泌素与癌基因表达及AgNORs计数的关系及其意义。

作者简介:何双梧(1936—),女,湖南省郴州市人,主任医师,教授,主要从事胃肠肿瘤与胃肠激素关系方面的研究,发表论文57篇。电话:(023)68757268
收稿日期:1999-10-05;修回日期:2000-04-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本 选择我院1996年8月至1997年4月行大肠癌根治术的标本48例，其中男29例，女19例，年龄34~77岁，平均57.5岁。对照组取正常大肠粘膜10例，男7例，女3例，年龄27~66岁，平均40.2岁，其中直肠内脱垂3例，乙状结肠扭转2例，意外死亡5例。所有标本均经病理检查确诊。

1.1.2 试剂 胃泌素多克隆抗体和过氧化酶标记的链酶卵白素(S-P)试剂盒购自美国ZYMED公司，c-myc单克隆抗体、c-fos多克隆抗体和ras p21单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司。50%硝酸银：用去离子水配制，硝酸银溶解后过滤，置棕色瓶中备用，用前再过滤。

1.2 方法

1.2.1 组织标本的采取 切取手术切除的新鲜大肠癌组织、癌旁3 cm及6 cm处大肠粘膜各3 g，置4%多聚甲醛液中固定，常规脱水，石蜡包埋切片。

1.2.2 胃泌素、c-myc、c-fos及ras p21免疫组织化学染色 采用S-P方法，按试剂盒说明进行，一抗稀释度胃泌素为1∶50，c-myc、c-fos和ras p21均为1∶100，c-myc、c-fos和ras p21蛋白采用微波抗原修复。取正常胃窦粘膜作胃泌素阳性对照。已知阳性的肝癌组织作c-myc、c-fos和ras p21阳性对照，PBS代替一抗作阴性对照。以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性标志，观察5个高倍镜视野，阳性细胞数>5个/视野定为阳性，阳性细胞数<5个/视野为阴性。

1.2.3 大肠癌组织AgNORs计数 采用改良银染法，结果用100倍油镜观察，细胞核背景呈淡黄色，AgNORs颗粒呈棕黑色，计算50~200个细胞内AgNORs颗粒数，算出其平均植。

1.2.4 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验，率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 大肠癌组织胃泌素、c-myc、c-fos、ras p21表达的阳性率及AgNORs计数

48例大肠癌组织中胃泌素、c-myc、c-fos及ras p21表达的阳性率分别为39.6%、54.2%、47.9%和54.2%%，AgNORs计数为7.10±1.48，均显著高于癌旁粘膜和正常大肠粘膜($P<0.01$)，见表1。

表1 大肠癌组织胃泌素、c-myc、c-fos、ras p21的表达及AgNORs计数

Tab 1 Expression of gastrin, c-myc, c-fos, ras p21 and AgNORs count in colorectal carcinoma

Group	n	Gastrin$^+$(%)	c-myc$^+$(%)	c-fos$^+$(%)	ras p21$^+$(%)	AgNORs
Carcinoma	48	19(39.6)**	26(54.2)**	23(47.9)**	26(54.2)**	7.10±1.48**
3 cm adjacent mucosa	48	2(4.2)	12(25.0)	9(18.8)	10(20.8)	3.65±1.04△△
6 cm adjacent mucosa	48	0(0)	7(14.6)	4(8.3)	6(12.5)	2.88±0.73
Normal	10	9(0)	1(0.0)	1(10.0)	2(20.0)	2.85±0.60

**: $P<0.01$ *vs* 3 cm, 6 cm adjacent mucosa and normal; △△: $P<0.01$ *vs* 6 cm adjacent mucosa and normal

2.2 不同病理类型大肠癌组织胃泌素、c-myc、c-fos和ras p21的表达及AgNORs计数

高分化腺癌组胃泌素表达阳性率明显高于低分化腺癌和粘液腺癌组($P<0.05$)。c-myc、c-fos和ras p21表达的阳性率及AgNORs计数在各病理类型组间差异不显著，见表2。

表2 大肠癌不同病理类型胃泌素、c-myc、-fos、ras p21的表达及AgNORs计数

Tab 2 Expression of gastrin, c-myc, c-fos, ras p21 and AgNORs count in different type of colorectal carcinoma

Pathological type	n	Gastrin$^+$(%)	c-myc$^+$(%)	c-fos$^+$(%)	ras p21$^+$(%)	AgNORs
Highly-differentiated	26	14(52.9)*	15(57.7)	13(50.0)	15(57.7)	7.12±1.80
Moderately-differentiated	12	4(33.3)	5(41.7)	7(58.3)	6(50.0)	7.25±0.86
Poorly-differentiated and mucinous adenocarcinoma	10	1(10.0)	6(60.0)	3(30.0)	5(50.0)	7.11±1.20

*: $P<0.05$ *vs* poorly-differentiated and mucinous adenocarcinoma

2.3 大肠癌组织胃泌素表达与c-myc、c-fos、ras p21和AgNORs计数的关系

大肠癌组织胃泌素阳性表达组c-myc、c-fos阳性率和AgNORs计数均显著高于胃泌素阴性表达组($P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.01$)，胃泌素阳性表达组阳性率与胃泌素阴性表达组比较无显著意义，见表3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　大肠癌组织胃泌素与表达 c-myc、c-fos、ras p21 和 AgNORs 计数的关系

Tab 3　Relationship of the expression of gastrin and c-myc, c-fos, ras p21 wiht AgNORs count in colorectal carcinoma

Group	n	c-myc^{+}(%)	c-fos^{+}(%)	ras p21^{+}(%)	AgNORs
Gastrin positive	19	15(78.9)	14(73.7)**	11(57.9)	7.84±1.30**
Gastrin negative	29	11(37.9)	9(31.0)	15(51.7)	6.62±1.40

*: $P<0.01$, **: $P<0.01$ *vs* gastrin negative group

3　讨论

胃泌素是一类小分子多肽激素, 对某些大肠癌具有促增殖作用, 一些学者认为胃泌素是一种自分泌生长因子。Monges 等[1] 检测 6 例结肠癌和 1 例结肠癌肝转移灶, 发现均存在胃泌素相关 mRNA, 其 mRNA 序列与正常人 G 细胞胃泌素 mRNA 相同。Artru 等[2] 用 [^{3}H]-胸腺嘧啶核苷掺入法对大肠癌细胞株 LoVo 生长有促进作用, 测定细胞株内胃泌素含量为 16 pmol/L, 细胞外介质为 4.5 pmol/L。Finley 等[3] 用组化法发现至少有 50%的大肠癌细胞胃泌素表达阳性。本实验结果 48 例大肠癌组织中 19 例胃泌素阳性, 阳性率为 39.6%, 明显高于癌旁粘膜及正常粘膜, 以高分化腺癌胃泌素阳性表达率最高(53.9%), 表明部分大肠癌可通过自分泌方式产生胃泌素。胃泌素 mRNA 翻译后形成胃泌素前体, 需在多种酶及辅助因子参与下, 最终形成成熟的胃泌素。分化良好的癌细胞具有较为完善的肽类加工酶及辅助因子, 使成熟的胃泌素增加, 而分泌不良的癌细胞中酶及辅助因子功能低下或缺乏, 胃泌素前体加工成熟不全, 致成熟的胃泌素产生不足[4], 故高分化腺癌胃泌素表达明显高于低分化腺癌。

我们首次将 AgNORs 技术用于胃泌素对大肠癌促增殖作用的临床研究。AgNORs 计数可反映核仁结构、功能、rRNA 的转录活性和细胞增殖活性[5]。本实验结果显示大肠癌组织 AgNORs 计数显著高于癌旁和正常粘膜, 癌旁 3 cm 粘膜较癌旁 6 cm 及正常粘膜高, 表明癌组织及癌旁 3 cm 粘膜 DNA 合成处于紊乱状态, 细胞增殖调节失控, 且大肠癌胃泌素阳性组 AgNORs 计数显著高于胃泌素阴性组, 说明内源性胃泌素对大肠癌具有促生长作用。

癌基因 c-myc、c-fos 是一类核分裂信号效应蛋白, 可启动与增殖有关的基因转录, 使细胞分裂和增殖。ras 癌基因编码一个 21×10^{3} 蛋白, 参与多种生长因子受体的信号传导调节, 突变的 ras 处于持续激活状态, 明显增强细胞的有丝分裂。本实验结果大肠癌组织 c-myc、c-fos 和 ras p21 癌基因的表达均明显高于癌旁粘膜和正常粘膜, 癌旁 3 cm 和 6 cm 与正常粘膜比较无显著差异, 大肠癌组织胃泌素阳性组中 c-myc 和 c-fos 表达明显高于胃泌素阴性组, 表明胃泌素在大肠癌的促增殖作用中与多个癌基因的激活有关。Wang 等[6] 发现胃癌细胞株 IEC-6 在胃泌素作用下 c-myc mRNA 迅速出现, 其表达增加的最大量为正常为 7.5 倍。Andrea 等[7] 报告胃泌素对 AR4-2J 细胞株有促增殖作用, 并能诱导 c-myc、mRNA 含量增加。Seva 等[8] 研究发现胃泌素呈剂量和时间依赖关系刺激丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的活化。ras p21 可通过 MAPK 通路与胃泌素受体连接, 从而引起细胞反应。结合本实验结果提示部分大肠癌细胞自分泌产生胃泌素后, 能与癌细胞膜上特异性的胃泌素受体结合, 经细胞膜转导入细胞浆内产生环磷酸腺苷(cAMP)、三磷酸肌醇(IP_3)、Ca^{2+} 等第二信使, 最后传入细胞核内影响靶细胞 RNA、DNA 及蛋白质合成, 这其中包括蛋白酶活化、磷脂酶激活、离子跨膜流动等多种生物效应, 增加 c-myc、c-fos 等癌基因的表达, 从而促进癌细胞的增殖[9,10]。胃泌素对大肠癌促增殖作用的机制十分复杂, 有待进一步研究。

研究胃泌素对大肠癌促生长作用的机制, 有助于寻找抑制肿瘤生长的胃泌素受体拮抗剂或利用信号转导通路开展基因治疗使癌细胞凋亡。胃泌素受体拮抗剂丙谷胺已用于临床, 可减少大肠癌患者的复发, 延长生存时间[11]。高分化腺癌组织中胃泌素阳性表达率高, 选择这类病人进行抗胃泌素治疗可能有效, 研制安全、高效的抗胃泌素药物, 将为大肠癌的治疗开辟一条新的非细胞毒性的辅助治疗途径。

参考文献:

[1] Monges G, Biagini P, Cantaloube J F, *et al*. Detection of gastrin mRNA in fresh human colonic carcinoma by reverse transcription polymerase chain[J]. J Mol Endocinol, 1993, 11(2): 223—229.

[2] Artru P, Attoub S, Levasseur S, *et al*. Gastrin-17 and G17-gly induce proliferation of LoVo cells through the CCK B/gastrin receptor[J]. Gastroenterol Clin Biol, 1998, 22(6~7): 607—612.

[3] Finley G G, Koski R A, Melihem M F, *et al*. Expression of the gastrin gene in the normal human colon and colorectal adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 1993, 53(12): 2 919—2 926.

[4] Sigh P, Xy Z, Dai B, *et al*. Incomplete processing of progastrin expressed by human colon cancer cells: role of noncarboxyamidate gastrin[J]. Am J Physiol, 1994, 266(3 Pt 1): G459—468.

[5] 陈至善, 熊显华. 结肠癌增殖细胞的研究[J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(3): 154—155.

[6] Wang J Y, Wang H L, Johnson L K. Gastrin stimulates expression of protooncogene c-myc through a process in involving polyamines in IEC-6 cells[J]. Am J Physiol, 1995, 269(Cell physiol 38): C1 474—1 481.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[7] Andrea T, Yohiaki T, Catherine S, *et al*. Gastrin and glycine-extended progastrin processing intermediates induces different programs of early gene activation[J]. J Biol Chem, 1995, 270(47): 28 337—28 341.

[8] Seva C, Kowalski-Chauvel A, Blanchet J S, *et al*. Gastrin induces tyrosine phosphorylation of Shc proteins and their association with the Grb2/Sos complex[J]. FEBS Lett, 1996, 378(1): 74—78.

[9] Hill C S, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity[J]. Cell, 1995, 80(2): 199—211.

[10] He S W, Shen K Q, He Y J, *et al*. Regulatory effect and mechanism of gastrin and its antagonists on colorectal carcinoma [J]. World J Gastroenteology, 1999, 5(5): 408—416.

[11] Kameyama M, Nakamoro S, Imaoka S, *et al*. Adjuvant chemo-endocrine chemotherapy with gastrin antagonist after resection of liver metastasis in colrectal cancer[J]. Gan To Kagakn Ryoho, 1994, 21(13): 2 169—2 171.

（编辑 陈聪连）

（上接1064页）

RPMI1640培养液，MTT（华美生物工程公司），IL-2，IL-6放免试剂盒（解放军总院东亚免疫技术研究所提供），淋巴细胞分离液（上海化学试剂工厂提供），L-NAME（sigma）；ELISA检测仪（四川分析仪器设备厂），细胞培养箱（美国），全自动V闪烁记数仪（法国）。

1.2 实验操作

实验期间，动物进食、饮水无限制，动物随机分为正常对照组，低毒组（0.5 LD_{50}= 1.60 mg/kg）和高毒组（0.8 LD_{50}= 2.70 mg/kg），各组动物分别于中毒后4、24、72和120 h不同时相点活杀取脾，称重并计算脾净重/体重比值，以%表示脾/体比值。于适量1640培养液中剪碎，100目尼龙网过滤，等量培养液洗3次，离心5 min，弃上清液，再加入适量培养液洗3次，以培养液调整细胞数为10^6/ml于37 ℃，5%CO_2培养箱中培养。然后分别加入COA和LPS（各5孔）培养48 h，于终止前4 h加入MTT（5 μl，20 μl/孔）观察结晶形成情况并拍照，离心并小心吸取上清，加二甲亚砜（50 μl/孔）待结晶完全溶解后于ELISA检测仪器检测T、B淋巴细胞的转化和增殖情况。用放免试剂盒方法测定培养液中IL-2、IL-6浓度。

1.3 统计学处理

所有数据以$\bar{x} \pm s$表示，以本校数学教研室设计的SPMR医用统计程序包进行多因素及双因素方差分析和t检验。

2 结果

大鼠硫芥中毒后4 h脾重/体重比已开始下降。中毒后3 d，大鼠脾重/体重比最低，0.5 LD_{50}和0.8 LD_{50}中毒组分别为对照组的0.41%±0.11%和0.23%±0.94%。中毒后5d，大鼠脾重/体重比有所恢复，但仍明显低于对照组。硫芥中毒24 h，T淋巴细胞的转化增殖开始明显下降，3 d降低并与对照组比较有非常显著差异（$P<0.01$），5 d逐渐呈恢复，但仍有显著差异。与T淋巴细胞的变化相似，硫芥中毒后4 h，B淋巴的细胞的转化增殖明显降低（$P<0.05$）。3 d下降至最低水平（$P<0.01$）。5 d后逐渐呈恢复趋势，从二剂量比较可见，B淋巴细胞硫芥中毒剂量加大转化增殖抑制加重。中毒4 h，硫芥中毒大鼠脾淋巴细胞培养上清液IL-2含量即明显降低（$P<0.01$）。1 d和3 d其含量降低已超出试剂盒检测灵敏度范围无法取得数据，5 d逐渐恢复但IL-2含量与对照组比较仍差异明显（$P<0.01$）。对照组大鼠培养淋巴细胞上清液中IL-6含量为（467.93±15.63）ng/ml，0.8 LD_{50}硫芥中毒后4 h开始下降，72 h降至（176.98±16.31）ng/ml（$P<0.01$），120 h有所回升，但仍然明显低与对照组（$P<0.01$）。

3 讨论

淋巴细胞对硫芥极其敏感，大鼠硫芥中毒后淋巴细胞呈进行性下降。此脾/体比值下降较早，而且严重。这改变反映了淋巴细胞的作用趋势。脾脏是免疫活性细胞积聚的场所，免疫功能变化必定反映在免疫器官改变[3]免疫功能的降低显然表现在脾重的下降，换而言之，脾脏重量的下降是硫芥的细胞毒性作用所致淋巴细胞数量下降的结果。结果表明，硫芥中毒后机体免疫功能严重抑制，具有出现早，恢复亦快的特点。

淋巴细胞的激活和增殖是发挥各种免疫功能的前提和条件[5]，机体免疫功能的下降首先表现在T、B淋巴细胞的转化和增殖能力。中毒后淋巴细胞转化和增殖能力与中毒4 h无明显变化，而B细胞则明显降低，二者于中毒后3d达最低水平。5 d开始恢复，此结果提示T、B淋巴细胞对硫芥敏感性有所不同。

T、B淋巴细胞的转化和增殖能力受细胞数量、刺激物的性质、细胞表面的受体等多种因素的影响。从结果可见引起T、B细胞转化和增殖力下降可能是硫芥中毒所致细胞数量下降的原因。淋巴细胞分泌的细胞因子IL-2、IL-6在硫芥中毒后的含量变化趋势与细胞数量变化一致。

综上所述，硫芥中毒后机体免疫功能明显抑制，具有体液免疫比细胞免疫更为敏感的特点。当硫芥引起免疫功能下降，会大大增加中毒后感染机会，威胁机体功能的恢复。

因此，硫芥中毒时，及早评价和提高机体免疫功能的措施具有重要意义。

关键词：硫/中毒；淋巴细胞
中图法分类号：R595.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] Papageorgiou A, Nikolaropoulos S S, Arsenou E S, *et al*. Enhanced coytogenetic and antineoplastic effects by the combined action of two esteric steroidal derivatives of nitrogen mustards[J]. Chemotherapy, 1999, 45(1): 61—67.

[2] Lardot C, Dubois V, Lison D. Sulfur mustard upregulates the expression of interleukin-8 in cultured human keratinocytes[J]. Toxicol Lett, 1999, 110(1—2): 29—33.

（编辑 谢义霞）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net